

KURZMITTEILUNGEN

Untersuchungen zur Wirkung der Nikotinsäure auf die stimulierte Lipolyse

Studies on the action of nicotinic acid on stimulated lipolysis

Von P. SCHWANDT und Th. HARTMANN

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. H. Schwiege)

(Eingegangen am 22. Juni 1968)

Nikotinsäure ist in zahlreichen Untersuchungen zur Hemmung der Fettmobilisation verwandt worden; über die Angriffspunkte dieser Substanz im lipolytischen System liegen z. T. widersprüchliche Angaben vor. So halten CARLSON und BALLY (1) sowie BJÖRNTROP (2) eine Hemmung der Lipase durch Nikotinsäure genauso für möglich wie eine Begünstigung der Reveresterung. STOCK und WESTERMANN (3) nehmen an, daß das lipolytische System durch Nikotinsäure lipasenäher blockiert wird als durch Sympathicolitica. PETERSON und Mitarbeiter (4) konnten die durch Theophyllin induzierte Lipolyse mit Nikotinsäure kompetitiv hemmen und keine direkte Wirkung auf die Lipaseaktivität nachweisen; sie vermuten, daß Nikotinsäure über eine Veränderung des Spiegels von cyclischem AMP lipolysehemmend wirkt. KRISHNA und Mitarbeiter (5) konnten die Hemmwirkung von Nikotinsäure auf die durch Theophyllin induzierte Lipolyse durch Zugabe von cyclischem AMP aufheben und mit 10 nm Nikotinsäure eine Aktivierung der Phosphodiesterase¹⁾ aus Fettgewebe nachweisen; sie nehmen an, daß Nikotinsäure zumindest teilweise über eine Aktivierung der Phosphodiesterase lipolysehemmend wirkt. Im Gegensatz dazu fanden KUPIECKI und MARSHALL (6), daß Nikotinsäure in Konzentrationen von 10 μ M bis 10 mM keinen Einfluß auf die Phosphodiesterase des Fettgewebes hat. Wir haben untersucht, ob Nikotinsäure die lipolytische Wirkung von cyclischem AMP hemmt und ob sich mit Theophyllin der Hemmeffekt von Nikotinsäure auf die mit ACTH stimulierte Lipolyse aufheben läßt.

Methodik

Die Untersuchungen wurden in vitro am epididymalen Fettgewebe von etwa 300 g schweren Wistar-Ratten (mit Altromin-Pellets ad libitum gefüttert) entsprechend früheren Angaben (7) durchgeführt. In einer Versuchsreihe wurden pro Inkubationsansatz (3,0 ml) 1 mMol Dibutyryl-A-3',5'-MP (Fa. Boehringer, Mannheim) und 5, 50, 100 und 1000 μ g Nikotinsäure (Fa. Merck Darmstadt) zugesetzt. Bei den übrigen Versuchen waren im Ansatz folgende Substanzen enthalten: 0,03 I. E. ACTH (Fa. Schering, Berlin), 1 mMol Theophyllin (Fa. Homburg-Chemie, Frankfurt) und 1 mMol Nikotinsäure. Bei einem Teil dieser Versuche wurden Theophyllin und Nikotinsäure bei Inkubationsbeginn zusammen zugesetzt und bei einem anderen Teil getrennt, d. h. zu Beginn der Inkubation und 1 Std. danach. Die freien Fettsäuren im Inkubationsmedium wurden einheitlich nach 3stdg. Inkubationsdauer bestimmt.

Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt, daß die mit 1 mMol Dibutyryl-A-3',5'-MP von $1,56 \pm 0,74$ mVal/l auf $4,71 \pm 1,43$ mVal/l stimulierte Freisetzung freier Fettsäuren auch mit hohen Konzentrationen von Nikotinsäure nicht zu hemmen war.

Die durch ACTH stimulierte Lipolyse war nach 3stdg. Inkubation mit Nikotinsäure um 29% gehemmt; im gleichen Zeitraum ließ sich die ACTH induzierte Fettsäurefreisetzung mit Theophyllin um 19% steigern. Wurden dagegen zu Inkubationsbeginn

¹⁾ Phosphodiesterase = Orthophosphorsäurediester Phosphohydrolase (EC 3.1.4.1).

Tab. 1

Einfluß verschiedener Nikotinsäurekonzentrationen auf die mit 1 mMol Dibutyryl-A-3',5'-MP/Ansatz stimulierte Lipolyse in vitro. Die Mengenangaben beziehen sich auf 3 ml Inkubationsmedium. Die freien Fettsäuren sind in mVal/l Inkubationsmedium/250 mg Fettgewebe/3 Stdn. angegeben

Nikotinsäure (μ g/3 ml)	n	freie Fettsäuren
0	16	$4,71 \pm 1,43$
5	10	$4,56 \pm 0,85$
50	6	$4,86 \pm 0,44$
100	10	$4,83 \pm 1,01$
1000	8	$4,69 \pm 1,04$

Theophyllin und Nikotinsäure in äquimolaren Konzentrationen zugegeben, betrug die Hemmung der mit ACTH stimulierten Lipolyse nur 5%.

In Abbildung 1 sind die Differenzwerte der freien Fettsäuren gegenüber der Spontanlipolyse bei Zusatz von Theophyllin und Nikotinsäure in verschiedener Reihenfolge zu dem mit ACTH inkubierten Fettgewebe dargestellt. Wurde zuerst Theophyllin zugesetzt, so war durch Nikotinsäurezusatz nach 1 Std. keine

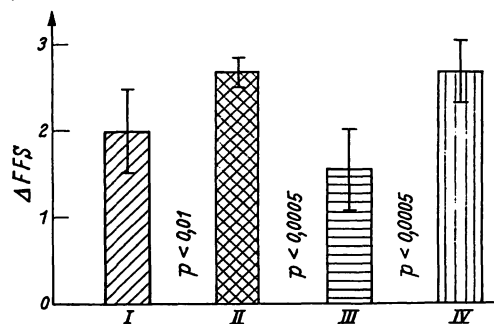


Abb. 1

Einfluß von Theophyllin und Nikotinsäure auf die mit ACTH stimulierte Lipolyse in vitro. Die Differenzwerte der freien Fettsäuren (Δ FFS) gegenüber der Spontanlipolyse sind in mVal/l Inkubationsmedium/250 mg Fettgewebe/3 Stdn. angegeben

- I 0,03 I. E. ACTH
 II 0,03 I. E. ACTH 1 mMol Theophyllin
 III 0,03 I. E. ACTH 1 mMol Nikotinsäure; nach 1 Std. 1 mMol Theophyllin
 IV 0,03 I. E. ACTH 1 mMol Theophyllin; nach 1 Std. 1 mMol Nikotinsäure

Alle Mengenangaben beziehen sich auf 3 ml Inkubationsmedium.

signifikante Änderung ($2,70 \pm 0,38$ mVal/l; $n = 6$) gegenüber der mit Theophyllin und ACTH stimulierten Lipolyse ($2,69 \pm 0,18$ mVal/l; $n = 6$) zu beobachten. Im Vergleich zu der nur durch ACTH induzierten Fettsäurefreisetzung ($1,99 \pm 0,49$ mVal/l) fanden sich hingegen immer noch signifikant höhere Werte freier Fettsäuren ($p < 0,025$). — Bei Zusatz von Nikotinsäure zu Beginn der Inkubation und von Theophyllin nach 1 Std. war die mit ACTH und Theophyllin stimulierte Lipolyse signifikant gehemmt ($1,55 \pm 0,49$ mVal/l; $n = 9$; $p < 0,005$); der Unterschied zu der nur mit ACTH stimulierten Freisetzung freier Fettsäuren war dagegen nicht mehr signifikant ($p < 0,15$).

Diskussion

Nach den gegenwärtigen Vorstellungen über das Lipolysesystem (8) sind drei Angriffspunkte für die Hemmwirkung der Nikotinsäure denkbar:

1. Hemmung der Bildung von cyclischem 3',5'-AMP über die Adenylcyclase,
2. Stimulierung der Phosphodiesterase,
3. Hemmung der hormonempfindlichen Triglyceridlipase.

Gegen die erstgenannte Möglichkeit sprechen unsere Befunde, nach denen durch Zusatz von Theophyllin die Hemmwirkung von Nikotinsäure auf die mit ACTH stimulierte Lipolyse annähernd aufgehoben wird; dabei besteht kein Unterschied, ob Nikotinsäure und Theophyllin gleich bei Inkubationsbeginn zugesetzt werden oder ob Theophyllin erst 1 Std. später zugegeben wird. ACTH erhöht

bekanntlich über eine Stimulierung der Adenylcyclase den Spiegel von cyclischem 3',5'-AMP; Theophyllin hemmt den Abbau dieses cyclischen Monophosphats über eine Blockierung der Phosphodiesterase (8). Nimmt man eine Hemmung der Adenylcyclase durch Nikotinsäure an, dann müßte auch nach Zusatz von Theophyllin der AMP-Spiegel erniedrigt bleiben, da ja Theophyllin nicht zu einer vermehrten Bildung von 3',5'-AMP führt; das ist nach unseren Befunden nicht der Fall.

Eine Stimulierung der Phosphodiesterase durch Nikotinsäure erscheint aufgrund des Befundes einer fehlenden Hemmwirkung von Nikotinsäure auf die mit Dibutyryl-A-3',5'-MP stimulierte Lipolyse zunächst ebenfalls unwahrscheinlich. Es ist jedoch bekannt, daß Dibutyryl-A-3',5'-MP von der Phosphodiesterase nicht abgebaut wird (9). Das Acylderivat haben wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren (9–11) deshalb zur Stimulierung der Lipolyse verwandt, weil cyclisches 3',5'-AMP wegen seiner schlechten Membrangängigkeit kaum lipolytisch wirkt (9). Die fehlende Wirkung von Nikotinsäure auf die mit Dibutyryl-A-3',5'-MP stimulierte Lipolyse spricht also keineswegs gegen die Annahme von KRISHNA und Mitarbeitern (5). Für eine Stimulierung der Phosphodiesterase durch Nikotinsäure könnte die Tatsache herangezogen werden, daß die mit ACTH und Theophyllin stimulierte Fettsäurefreisetzung durch Zugabe von Nikotinsäure nach 1 Std. nicht gehemmt wird und daß die hierbei gemessenen Fettsäurewerte sogar noch über denen bei der mit ACTH stimulierten Lipolyse liegen: die Phosphodiesterase ist offenbar durch Theophyllin so weitgehend blockiert, daß Nikotinsäure nicht in der Lage ist, dieses 3',5'-AMP abbauende Enzym ausreichend zu reaktivieren.

Die dritte Möglichkeit — Hemmung der hormonempfindlichen Triglyceridlipase — scheidet deshalb aus, weil sich die Hemmwirkung von Nikotinsäure mit Theophyllin aufheben läßt. Zu dem gleichen Ergebnis kommen PETERSON und Mitarbeiter (4),

die keine Nikotinsäurewirkung auf die hormonempfindliche Lipase nachweisen konnten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß aufgrund der z. Z. gültigen Vorstellungen über das lipolytische System eine Stimulierung der Phosphodiesterase durch Nikotinsäure als mögliche Erklärung für die Hemmwirkung dieser Substanz auf die hormonstimulierte Lipolyse diskutiert werden kann.

Literatur

1. CARLSON, L. A. und P. R. BALLY, In: Handbook of Physiology, Section V, Adipose Tissue, p. 557. Ed. E. A. RENOLD und C. F. CAHILL. Amer. Physiol. Soc., Washington (1965).
2. BJÖRNTORP, P., Metabolism 14, 836 (1965).
3. STOCK, K. und E. WESTERMANN, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 254, 334 (1966).
4. PETERSON, M. J., C. C. HILLMAN und J. ASHMORE, Federation Proc. 26, 400 (1967).
5. KRISHNA, G., B. WEISS, J. I. DAVIES und S. HYNIE, Federation Proc. 25, 719 (1966).
6. KUPIECKI, F. P. und N. B. MARSHALL, J. Pharmacol. Exper. Therap. Baltimore 160, 166 (1968).
7. SCHWANDT, P., M. KNEDEL und R. LINDLBAUER, diese Z. 6, 81 (1968).
8. SUTHERLAND, E. W. und R. W. BUTCHER, In: Protein and Polypeptid Hormones, S. 141, Ed. M. MARGOULIES. Internat. Congr. Series No. 161, Excerpta Medica Foundation, Amsterdam-New York-London-Paris-Milan-Tokyo-Buenos Aires (1968).
9. BUTCHER, R. W., R. J. HO, H. C. MENG und E. W. SUTHERLAND, J. biol. Chemistry 240, 4515 (1965).
10. BRAY, G. A., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 621 (1967).
11. AULICH, A., K. STOCK und E. WESTERMANN, Life Sciences 6, 929 (1967).

Dr. P. Schwandt
I. Med. Univ. Klinik
8 München 15
Ziemssenstraße 1

Spektrophotometrische Messung von Porphyrinmethylester-Cu-Chelaten

Spectrophotometric measurement of porphyrin methyl ester-Cu chelates

Von M. Doss

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. R. Siegert)

(Eingegangen am 25. Juni 1968)

Über eine dünnstichtchromatographische Methode zur Isolierung und Bestimmung der Porphyrine als Methylester wurde vor kurzem berichtet (1, 2). Die Auftrennung erfolgte an Kieselgel-H-Platten in Lösungsmittelsystemen, die sich aus Benzol, Essigsäureäthylester, Butanol und Methanol zusammensetzen (1). Aus verschiedenem biologischen Material, wie Urin (1, 2), Erythrocyten (3, 4) und Bakterien (5), konnten chromatographisch reine Substanzen erhalten werden. Eine Rechromatographie ließ sich oft nicht umgehen, wenn kleine Porphyrinmengen mit größeren Anteilen anderer Chromogene im Chloroformextrakt vorlagen (2). Beimischungen von Lipoiden wie Glyceride, Glycerinphosphatide, Fettsäuren und ihre Methylester sowie Cholesterin und Cholesterinester haben keinen Einfluß auf die Bestimmung der Porphyrine (6).

Bei Versuchen, die analytische Empfindlichkeit der Methode zu verbessern, zeigte sich, daß Porphyrinmethylester innerhalb von 15 Min. mit einer Lösung von Kupfer(II)-acetat (0,05%, w/v) in Chloroform-Methanol (1:1, v/v) Chelate bilden, die über Wochen stabil bleiben. Nach Bildung der Chelate ist es nicht mehr erforderlich, die Proben vor Licht zu schützen (1, 7). Der Extinktionskoeffizient der einzelnen Porphyrinmethylester an der Soret-Bande erhöht sich bei der Cu-Chelatbildung um 60 bis 100% gegenüber der Registrierung in reinem Chloroform. Die Empfindlichkeit des spektrophotometrischen Nachweisbereiches wird

mit dem Porphyrinmethylester-Cu-Komplex jedoch nicht erreicht. Ein wesentlicher Vorteil der Messung besteht darin, daß die schmalbasige und spitze Absorptionsbande der Porphyrinmethylester-Cu-Chelate bei 400 nm (Abb.) durch Beimischungen anderer

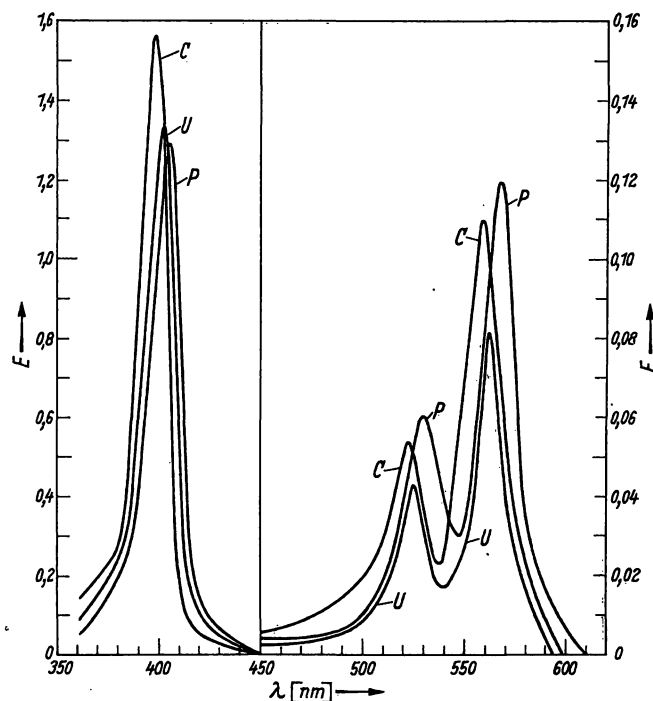


Abb. 1

Absorptionsspektren der Cu-Chelate von
(P) Protoporphyrin-IX-dimethylester (4,96 μM) aus Erythrocyten
(C) Koproporphyrin-III-tetramethylester (4,11 μM) von *Achromobacter metalcaligenes* und
(U) Uroporphyrin-III-oktamethylester (3,37 μM) aus Urin. Absorptionsmaxima vgl. Tab. Spektrophotometer „Cary M 15“.

Substanzen (Chromogene) weniger störrisch als die Soret-Bande der Porphyrinmethylester in organischen Lösungsmitteln (1, 2, 7). Damit wird eine Rechromatographie (2) zur Isolierung der Porphyrinmethylester in reiner Form weitgehend überflüssig.

Methodik

Vorbereitung zur Bestimmung der Porphyrine als Methylester aus biologischem Material

Die Porphyrine werden, wie beschrieben (2, 3), in gefriergetrocknetem Material zu Porphyrinmethylestern verestert und extrahiert. Für die Aufarbeitung einer Reihe von Proben (Leberzellkulturen (8), Erythrocyten aus 1 bis 2 ml Vollblut, Bakterien bis zu 20 mg Trockengewicht und bakterielle zellfreie Systeme mit einem Proteingehalt von 3 bis 8 mg (5)) wird ein Reagenzgefäß mit Schliff (9) verwendet. Gelangen größere Volumina zur Analyse, empfiehlt sich die Adsorption der Porphyrine an Talk (7). Nach Adsorption der freien Porphyrinsäuren (10 Min.) wird die Flüssigkeit über eine mit Filterpapier bedeckte Porzellannutsche abgesaugt, wobei sich das Filterpapier mit Talk beschichtet. Dieses wird anschließend bei 35° etwa 12 Std. getrocknet und mit Methanol-Schwefelsäure (5% v/v) zur Veresterung der adsorbierten Porphyrine versetzt.

Die Chromatographie erfolgt an DC-Fertigplatten (Schichtdicke 0,25 mm) Kieselgel F₂₅₄ (E. Merck) im Lösungsmittelsystem Benzol-Essigsäureäthylester-Methanol (85:13,5:1,5 v/v). Die Tetrapyrrolmethylester werden aus den abgenommenen Kieselgelzonen über Papierfilter mit Chloroform bzw. Chloroform-Methanol (1) eluiert, und das Lösungsmittel wird verdampft. In Kombination mit anderen Lösungsmittelsystemen kann auf demselben Chromatogramm auch Protohäminmethylester herausfraktioniert (8) und durch das Differenzspektrum (reduziert minus oxydiert (10)) bestimmt werden (8).

Spektrophotometrische Analyse

Kupfer(II)-acetat-Lösungen:

a) Stammlösung 0,2% (w/v): 400 mg (CH₃COO)₂Cu · H₂O werden in 100 ml Methanol p. a. bei Raumtemperatur gelöst (Magnetrührer) und mit 100 ml CHCl₃ p. a. versetzt. Aufbewahrung der Lösung bei +4°.

b) Gebrauchslösung 0,05% (w/v): Die Stammlösung wird mit CHCl₃-CH₃OH(1:1 v/v) 1:4 verdünnt.

Die Porphyrinmethylester werden in der 0,05proz. Kupferacetatlösung sorgfältig gelöst. Die Lösung bleibt zur Bildung der Cu-Chelate mindestens 10 Min. bei Raumtemperatur stehen. Die Substanzen werden zwischen 600 und 370 nm spektrophotometrisch gegen die Kupferacetat-Gebrauchslösung registriert (Abb.). Für Serienbestimmungen reicht die Schreibung ab 500 nm

bis zum jeweiligen Absorptionsmaximum aus. Die Eichkurve von Proto-, Kopro- und Uroporphyrinmethylester-Cu-Chelaten verläuft bis zu einer Extinktion von 1,2 linear. Der Verlauf der Eichkurve über diesen Bereich hinaus wurde nicht geprüft. Zur Berechnung werden millimolare Extinktionskoeffizienten angegeben (Tab.). Die Isolierung der verwendeten Substanzen

Tab. 1

Absorptionsmaxima und millimolare Extinktionskoeffizienten (d = 1 cm) von Porphyrinmethylester-Cu-Chelaten
Darstellung und Messung in einer Lösung von Kupfer(II)-acetat 0,05 % (v/v) in Chloroform-Methanol 1:1

Protoporphyrin-IX	λ_{\max}	404	530	568	nm
	ϵ_{mM}	277	12,1	27,9	
Koproporphyrin-I(III)	λ_{\max}	397	523	559	nm
	ϵ_{mM}	381	13,3	26,8	
Heptacarboxyporphyrin	λ_{\max}	402	529	567	nm
	ϵ_{mM}	368	12,9	24,3	
Uroporphyrin-I(III)	λ_{\max}	401	526	562	nm
	ϵ_{mM}	398	12,7	24,2	

erfolgte nach l. c. (1). Der Zeitpunkt der spektrometrischen Messung der Chelatlösung kann den Gegebenheiten angepaßt werden. Bei +4° aufbewahrte Lösungen zeigten nach 15 Tagen keine, nach 30 Tagen eine sehr geringe Erhöhung des Extinktion. Qualitative Verschiebungen der Absorption entstanden in diesem Zeitraum nicht. Änderungen in der Konzentration des Kupfer(II)-acetats zwischen 0,05 und 0,1% hatten keinen Einfluß auf die Höhe der millimolaren Extinktionskoeffizienten der Porphyrinmethylester-Cu-Chelate.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

1. Doss, M., J. Chromatog. 30, 265 (1967).
2. Doss, M. und W. MANNHEIM, diese Z. 5, 260 (1967).
3. Doss, M. und U. BODE, diese Z. 6, 383 (1968).
4. Doss, M., Dtsch. med. Wschr., in Druck.
5. Doss, M., Biochim. biophysica Acta, im Druck.
6. Doss, M. und U. BODE, J. Chromatog., 35, 248 (1968).
7. FALK, J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam-London-New York (1964).
8. Doss, M., Klin. Wschr., 46, 731 (1968).
9. Doss, M. und K. OETTER, diese Z. 3, 125 (1965).
10. PORRA, R. J. und O. T. G. JONES, Biochem. J., 87, 181 (1963).

Dr. Manfred Doss
355 Marburg (Lahn)
Pilgrimstein 2

Mehrzweck-Küvette für Immunodiffusionspräparate

Multipurpose cuvette for immunodiffusion preparations

Von M. PÉREZ-MIRANDA¹⁾ und HILDE GÖTZ

Aus der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg

(Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth)

(Eingegangen am 8. August 1968)

Komplette apparative Ausrüstungen für die heute im klinischen und experimentellen Laboratorium weit verbreiteten Agartechniken, wie Immunodiffusions- und Elektrophoresetechniken auf Objektträgern, stehen heute bereits von namhaften Firmen in verschiedener Ausführung zur Verfügung. Im Zuge der fortschreitenden Automatisierung laboratoriumstechnischer Ver-

fahren stellen derartige Angebote eine wahre Bereicherung dar. Es ist jedoch aufgefallen, daß in keinem der entsprechenden Angebote und auch in keiner der uns zugänglich gewordenen Arbeiten über Methodik und technische bzw. apparative Voraussetzungen für Analysen im Agargel, eine Kammer für das schwache Wässern oder für das Eintauchen von Agarplättchen in Inkubationslösungen angegeben ist.

Im folgenden soll deshalb eine Küvette beschrieben werden, die eine zuverlässige Behandlung von Agargelpräparaten auf Objektträgern gestattet. Die Konstruktion dieses u. E. platzsparenden und handlichen Behälters ist so beschaffen, daß vor allem ein Hinwegschieben der Agarschichten von den Glasplättchen mit Umkehren der Schichtseite und mit Vermischen der mit Analysen versehenen Agarstreifen mit Sicherheit vermieden wird.

Beschreibung

Die Küvette besteht aus zwei sich komplementierenden Teilen, einem Gestell und einer eng umschließenden Hülle mit Deckel-

¹⁾ Stipendiat der Alexander von Humboldt-Stiftung.

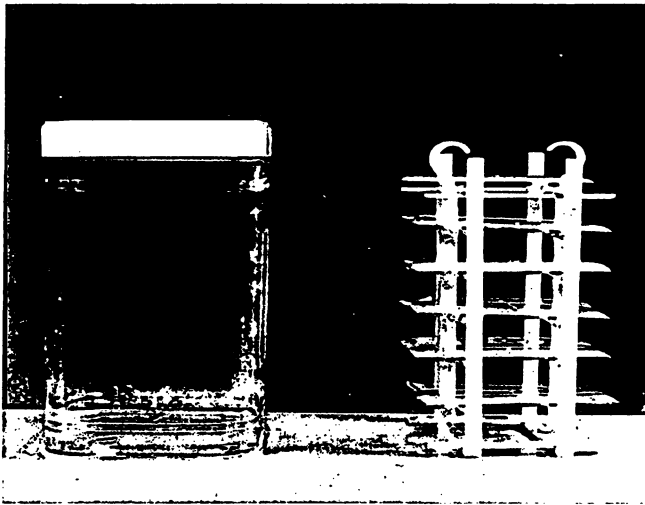


Abb. 1

Gehäuse (li.) und Objektträgergestell (re.) der Mehrzweck-Küvette

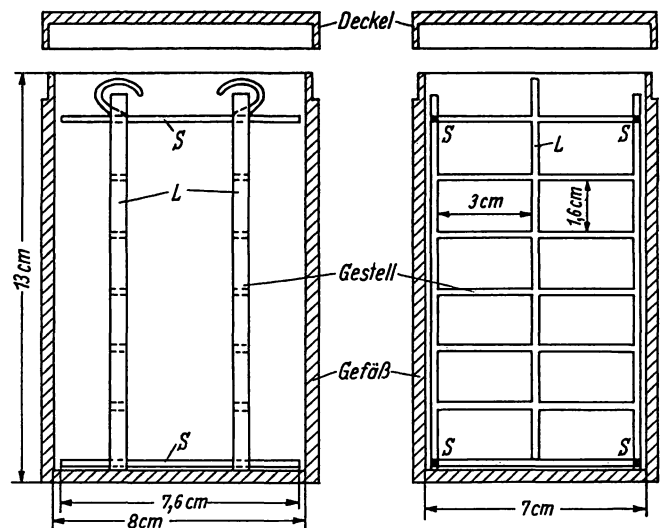


Abb. 2

Technische Angaben zum Aufbau einer Mehrzweck-Küvette für Agartechniken auf Objektträgern

verschluß (Abb. 1). Das Gestell dieser Mehrzweck-Küvette vermag insgesamt optimal 12, maximal 14 Objektträger zu fassen.

Das *Gestell* besteht aus zwei 12 cm langen Doppel-Leiterchen aus Kunststoff oder rostfreiem Stahl (Abb. 2—L), die einander im Abstand von 3,5 cm gegenüberstehen, und die durch vier kleine waagerechte Stangen (Abb. 2—S) an den oberen und unteren Enden verstrebt sind. An den oberen Enden befinden sich darüber hinaus zwei Griffe zum Einsenken bzw. Herausnehmen des Gestelles aus seiner Hülle. Die Querstangen haben die Länge eines Objektträgers, d. h. 7,6 cm; sie können diese Länge auch um 2 mm überragen. Die Zwischenräume zwischen den Leiterstangen betragen etwa $3 \times 1,6$ cm.

Der viereckige *Behälter* kann aus durchsichtigem Kunststoff, Plexiglas oder Glas hergestellt werden. Seine inneren Abmessungen betragen etwa 8×7 cm (Bodenfläche) \times 12,5 cm (Höhe).

Der *Deckel* muß luftdicht zu verschließen sein. Er besteht aus demselben Material wie der Behälter.

Verwendung

Die Konstruktion der Mehrzweck-Küvette erlaubt, wie der Name besagen soll, eine vielseitige Verwendbarkeit: sie bewährt sich also

nicht nur als zuverlässiges Gehäuse für alle Wässerungsprozesse von agarbeschiedenen Objektträgern, sondern sie eignet sich in gleichem Maße auch als Inkubationskammer wie als Kühlraum, wobei die jeweils erforderlichen Temperaturen lediglich über einen Wärme- oder Kühlmantel eingestellt zu werden brauchen. Im einzelnen kommen folgende Verwendungsmöglichkeiten in Frage:

Verwendung als Inkubations- bzw. Feuchtekammer

Verwendet man die Küvette als Inkubations- bzw. Feuchtekammer, etwa zum Auspräzipitieren von diffundierten Antigen- und Antikörpersystemen, so werden die einzelnen Präparate waagrecht auf die Sprossen der beiden Leiterchen gelegt. Im Falle der noch notwendigen Beschickung der Agarausparungen bzw. Kanäle (Immunoelektrophorese) kann diese mühelos mit den entsprechenden Lösungen bzw. Antiseren vorgenommen werden (Abb. 3). Das Gefäß wird nach den entsprechenden Vorbereitungen mit 10 bis 20 ml dest. Wasser gefüllt, mit dem Deckel luftdicht verschlossen und entweder bei Zimmertemperatur auf dem Laboratoriumstisch stehen gelassen oder in den Wärmeschrank gebracht.

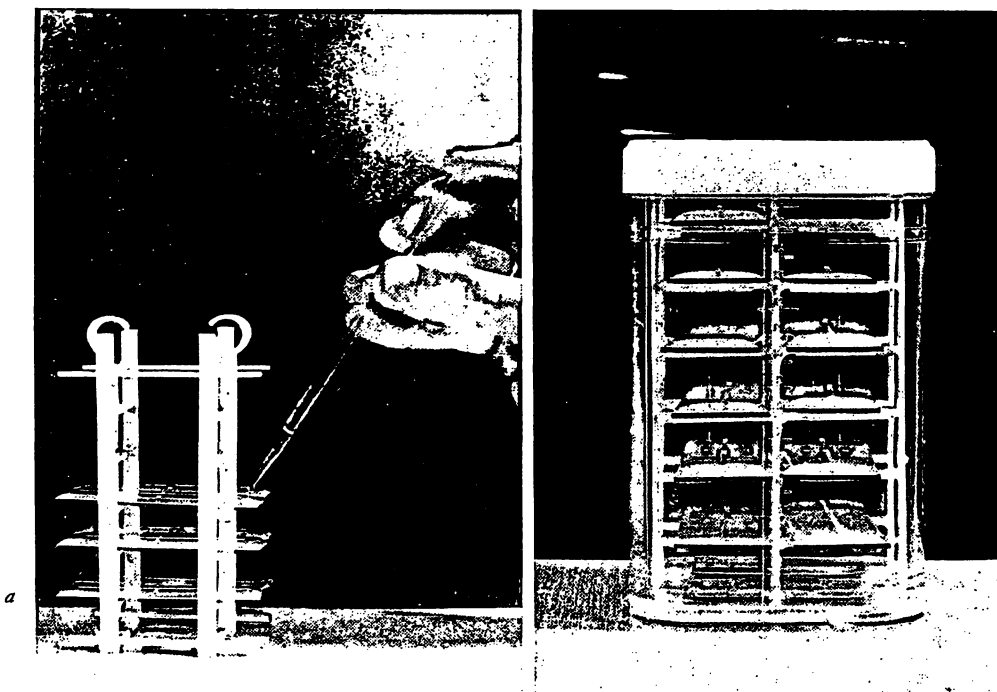


Abb. 3a und b

Beschicken der Agarplättchen auf Objektträgern nach deren Auflegen auf die Sprossen des Gestelles einer Mehrzweck-Küvette. Die vorbereiteten Agarplättchen bleiben in gleicher Position (Abb. 3a); nach dem Beschicken wird das Gestell insgesamt in die Küvette (z. B. als feuchte Kammer) eingebracht (Abb. 3b)

Verwendung als Inkubationskammer mit Substratlösungen für Fermentnachweis-Reaktionen

Die Agarplättchen werden nach abgeschlossener einfacher Elektrophorese wiederum auf die einzelnen Sprossen des Gestelles gelegt, mit dem Gestell in die Küvette eingebracht und danach mit der erforderlichen Inkubationslösung beschickt, wobei die Tränkung entweder über doppelte Schichten von Filtrierpapier oder durch Anfüllung der Kammer erfolgt. Die Küvette kann nunmehr in eine für den Ablauf der Fermentreaktion erwünschte, konstant zu haltende Umgebungstemperatur gebracht werden. In diesem Falle besteht der Vorteil dieser Küvette darin, daß die Bewegung des Behälters vom Laboratoriumstisch in den Wärmeschrank bzw. Inkubator und wieder zurück keine Verschiebung der Agarschichten von ihrer Unterlage mit sich bringt.

Verwendung der Küvette zur Wässerung bzw. Entfärbung oder Fixierung von Fraktionen im Agarmilieu

Hierfür eignet sich die Kammer insofern in ganz besonderem Maße, als sie ein mehrfaches Wechseln durch einfaches Herausnehmen des gesamten Gestelles aus der Küvette gestattet ohne Verschiebung der aufgelegten Agarplättchen und wiederum ohne ein Hinwegschieben der Agarschichten von den Objektträgern. Sie erlaubt sogar einen leichten Durchfluß von Spülflüssigkeit oder Entfärbelösungen, wodurch zugleich die einzelnen Arbeitsgänge wesentlich verkürzt werden können.

Verwendung der Mehrzweck-Küvette als Färbebad

In gleicher Weise kann die Küvette als Färbebad Verwendung finden, wobei hier neben den bereits erwähnten allgemeinen

Sicherheitsfaktoren für das Haftenbleiben der Agarschichten an ihren Objektträgern der Vorteil darin besteht, daß im Vergleich zu offenen Küvetten der Verdunstungseffekt der Färbelösung weitgehend herabgesetzt werden kann. Darüber hinaus können Färbelösungen unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Küvette beliebig hoch angefüllt werden kann, rationell aufgebraucht werden. Es sei schließlich darauf hingewiesen, daß selbstverständlich die Küvette für eine Vielzahl aufeinanderfolgender Vorgänge geeignet ist, ohne daß die beladenen Gestelle in ihrer Anordnung verändert zu werden brauchen.

Besprechung der Konstruktion

Die wesentlichen Vorteile der Küvette sind bereits im vorangegangenen Abschnitt über die Verwendungsmöglichkeiten erläutert worden. Es sei hier in Kürze auf einige andere, vorwiegend technische, Vorteile hingewiesen.

Die Küvette besteht aus transparentem Material. Ihr Hochformat bei kleinem Grundriß nimmt wenig Platz am Laboratoriumstisch bzw. im Inkubator ein. Ihre vielfältige Anwendbarkeit, möglicherweise sogar im Verlaufe eines Arbeitsganges, gestattet ein rationelles Verarbeiten der agarelektrophoretisch oder im Rahmen der Immunodiffusionstechniken angesetzten Analysen. Sie erscheint uns deshalb unentbehrlich in einer modernen Ausrüstung für Immunelektrophorese und Immunodiffusionstechniken.

Dr. M. Pérez-Miranda und
Priv. Doz. Dr. Hilde Götz
8520 Erlangen, Krankenhausstraße 12

Die Eisenbestimmung in frischen und gelagerten Seren

Determination of iron in fresh and stored sera

Von K. BONITZ und G. ROGGE

*Aus dem Zentrallaboratorium (Chefarzt: Dr. K. Bonitz)
des Allg. Krankenhauses Hamburg-Eilbek
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. P. Laurentius)*

(Eingegangen am 14. August 1968)

Die ersten Arbeiten über einen Gehalt des Serums an Eisen, welches nicht aus dem Hämoglobin stammt, gehen auf BARKAN zurück (1, 2). Der größte Teil dieses Eisens ist an die Serum-eiweißfraktion IV-7, die hauptsächlich aus β_1 -Globulinen besteht, gebunden. Üblicherweise bezeichnet man dieses Eisenträgerprotein Siderophilin oder Transferrin (3, 4).

Die meisten Bestimmungsmethoden benützen zur Spaltung dieses Eisen-Eiweiß-Komplexes Salzsäure, wobei die Reaktionszeit von der Säurekonzentration abhängig ist. Insbesondere bei Seren, die längere Zeit aufbewahrt wurden, können nach Behandlung mit verdünnter Salzsäure mitunter nur 75–80% des Serumeisens vom Eiweiß abgespalten werden (5). Auch eine Behandlung mit Trichloressigsäure allein bei Raumtemperatur genügt nicht zur vollständigen Freisetzung (6).

Der nächste Schritt der Bestimmung ist bei vielen Modifikationen die Abtrennung des Eiweißes. Eine Fällung mit Trichloressigsäure birgt mehrere Fehlerquellen in sich: Eisen kann mit in den Niederschlag gerissen werden (7, 8), oder es wird kein optisch klares Filtrat erzielt (9), oder es werden durch die Vielfalt der Einzeloperationen Eisenspuren eingeschleppt.

In letzter Zeit wurden einige Methoden beschrieben, die eine Eiweißfällung vermeiden und das Serumeisen direkt mit einem Farbreagenz bestimmen.

Durch Zugabe eines Detergens kann Eisen vom Eiweiß abgelöst werden und Farbkomplex sowie Eiweiß in Lösung gehalten

werden (10–12). Die Auswahl des geeigneten Detergens und die Abhängigkeit von wechselnden Qualitäten einzelner Chargen ist kritisch (13, 14). Ein bestimmtes Mengenverhältnis Serum zu Detergens muß eingehalten werden, die Einwirkungsdauer darf nicht zu kurz sein, mitunter treten Eiweißfällungen auf oder das im Detergens gelöste Reduktionsmittel neigt zur Zersetzung (15, 16).

Ebenfalls in letzter Zeit wurden Methoden bekannt, bei welchen Eisen in einem bestimmten pH-Bereich vom Eiweiß abgespalten wird und ohne Enteiweißung direkt mit einer Farbreaktion bestimmt wird. Verwendet wird z. B. ein Acetatpuffer von pH 4,5–5,5; die Übereinstimmung mit Werten in enteiweißtem Serum ist gut (17–19). A. L. SCHADE und Mitarbeiter fanden, daß in 0,2M Phosphatpuffer pH 6,8 der Eisen-Siderophilin-Komplex vollständig dissoziiert (20–22). Je niedriger das pH und je konzentrierter der Puffer, um so sicherer wird das Eisen abgespalten. D. E. SCHWARTZ hat auf diesem Prinzip eine Methode aufgebaut, bei der das freigesetzte Eisen mit Ascorbinsäure reduziert und dann mit sulfoniertem Bathophenanthrolin zu einem Farbkomplex umgesetzt wird, der photometrisch bestimmt werden kann (23, 24). Für die Durchführung der Eisenbestimmung nach dieser Methode sind gebrauchsfertige Reagenziensätze im Handel.

In jüngster Zeit wurde mitgeteilt, daß bei älteren Seren die Bestimmung des Eisens ohne vorhergehende Enteiweißung infolge Auftretens von Trübungen beim Pufferzusatz gestört wird, während mit frischen Seren die mit verschiedenen Methoden mit und ohne Enteiweißung gewonnenen Ergebnisse gut übereinstimmen (25).

Um festzustellen, wie oft im Durchschnitt mit Störungen bei der Analyse von gelagerten Seren zu rechnen ist, wurde Eisen ohne Enteiweißung jeweils in frischem Serum, nach 4 Tagen und nach 8 Tagen bestimmt (Merckotest Eisen, Art. Nr. 3307).

Die durchschnittliche Streuung der Werte (Präzision von Tag zu Tag) als Standardabweichung ausgedrückt, betrug $\pm 3,0 \mu\text{g}$ Eisen pro 100 ml. Von 100 Seren zeigten am 4. bzw. 5. Tag gegenüber dem Ausgangswert 9 Seren eine signifikante (größer als $\pm 5\%$) Abweichung, davon waren 7 Werte erhöht und 2 Werte erniedrigt. Am 8. Tag waren 12 Seren signifikant verändert, davon 9 erhöht

Tab. 1
Eisenbestimmung in gelagerten Seren

Serum Nr.	1. Tag $\mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$	4. bzw. 5. Tag $\mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$	$\Delta \mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$	$\Delta\%$	$\mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$	8. Tag $\Delta \mu\text{g Fe}/100\text{ ml}$	$\Delta\%$	$\pm s$	$\pm s\%$
36	31	32	+1	3,2	40	+9	22,5	4,9	14,4
39	294	301	+7	2,4	309	+15	5,1	7,5	2,5
41	88	82	-6	-7,5	70	-18	-25,7	9,2	11,5
48	96	120	+24	20,0	101	+5	5,0	12,7	12,0
56	68	86	+18	26,5	85	+17	25,0	10,1	12,7
63	156	167	+11	7,1	162	+6	3,8	5,5	3,4
64	32	30	-2	-6,2	18	-14	-43,7	7,6	28,4
66	31	31	0	0	42	+11	26,2	6,4	18,3
69	63	75	+12	19,0	65	+2	3,2	6,4	9,5
71	74	73	-1	1,4	82	+8	9,8	4,9	6,5
73	184	193	+9	4,9	209	+25	13,6	12,7	6,5
80	47	48	+1	2,1	34	-13	-27,7	7,8	18,2
82	82	87	+5	6,1	95	+13	15,9	6,6	7,5
89	32	42	+10	31,2	40	+8	20,0	5,3	13,9
97	152	167	+15	9,9	173	+21	13,8	10,8	6,6

und 3 erniedrigt. 3 Seren zeigten am 4. Tag einen Anstieg und waren am 8. Tag wieder abgefallen. Alle weiteren Einzelheiten können aus der Tabelle 1 entnommen werden.

Es zeigte sich damit, daß nur bei einem geringen Prozentsatz der auf Eisen untersuchten älteren Seren eine Erhöhung des Meßwertes zu erwarten ist. Unserer Meinung nach ist es für ein Routine-laboratorium nicht zu vertreten, daß auf die vereinfachte Ausführung der Eisenbestimmung verzichtet wird, nur um auch bei längere Zeit gelagerten Seren diejenigen (größenordnungsmäßig 10%) richtig zu bestimmen, in welchem anderenfalls um bis zu 25 μg pro 100 ml (absolut) zu hohe Eisenwerte erhalten werden.

Literatur

1. BARKAN, G., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 148, 124 (1925), 171, 194 (1927), 216, 1 (1933). — 2. BARKAN, G. und O. SCHALES, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 248, 96 (1937). — 3. EDSALL, J. T., Adv. in Prot. Chem. 3, 383 (1947). — 4. RAMSAY, W. N. M. in H. Sobotka und C. P. Stewart (Ed.) Adv. in Clin. Chem. 1, 1 (1958). — 5. PETERS T., TH. GIOVANIELLO, L. APT und J. ROSS, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 48, 280 (1956). — 6. KINGSLEY, G. R. und G. GETCHELL, Clin. Chem. New York 2, 175 (1956). — 7. BOTHWELL, T. H. und B. MALLETT, Biochem. J. 59, 599 (1955). — 8. RAMSAY, W. N. M., Biochem. J.

53, 227 (1953). — 9. HENRY, R. J., C. SOBEL und N. CHIAMORI, Clin. chimica Acta Amsterdam 3, 523, (1958). — 10. LAUBER, K., diese Z. 3, 96 (1965). — 11. SANFORD, R., J. Clin. Path. London 16, 174 (1963). — 12. WEBSTER, D., J. Clin. Path. London 13, 246 (1960). — 13. DRONSKI, H. und G. GALTS, Dtsch. Ges.wesen 21, 2457 (1966). — 14. HOPPE, F., Fortschr. Med. 84, 283 (1966). — 15. ASKEVOLD, R. und O. D. VELLAR, Scand. J. clin. Lab. Invest. 20, 122 (1967). — 16. SCHMIDT, G., Dtsch. Ges.wesen 22, 1686 (1967). — 17. BROWNSTEIN, H., Amer. J. Clin. Path. 47, 714 (1967). — 18. GOODWIN, J. F., B. MURPHY und M. GUILLEMETTA, Clin. Chem. New York 12, 47 (1966). — 19. NESS, A. T. und H. G. DICKERSON, Clin. chimica Acta Amsterdam 12, 579 (1965). — 20. LEVY, A. C. und P. VITTACCA, Clin. Chem. New York 7, 241 (1961). — 21. NELSON, C. W., Amer. J. Med. Techn. 30, 71 (1964). — 22. SCHADE, A. L., J. OYAMA, R. W. REINHART und I. R. MILLER, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87, 443 (1954). — 23. FÜHR, J., Med. Monatsschr. 19, 281 (1965). — 24. SCHWARTZ, D. E., Bull. der Schweiz. Vereinigung f. klin. Chemie, 1957, Nr. 1. — 25. HOEFLMAYER, J. und R. FRIED, Med. Klinik 61, 1820 (1966).

Dr. K. Bonitz
2 Hamburg 22
Friedrichsberger Str. 60

MITTEILUNGEN

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie

Auf der 13. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie in Ulm/Donau wurde Prof. Dr. K. LENNERT (Kiel) zum neuen Kongreß-Präsidenten für 1969 gewählt. Die nächste Tagung der Gesellschaft wird in der ersten Septemberwoche 1969 in Kiel stattfinden.

Prof. Dr. W. STICH (München) wurde für die Zeit von 1968—1970 zum Vorsitzenden der Gesellschaft wiedergewählt.

Dr. K. G. VON BOROVICZENY (Freiburg/Breisgau) wurde zum neuen Sekretär der Gesellschaft gewählt.

Auf der Tagung wurde außerdem ein Ausschuß für die Vorbereitung des XIII. Kongresses der Internationalen Gesellschaft für Hämatologie gebildet, der 1970 in München unter dem Präsidium von Prof. Dr. L. HEILMEYER (Ulm) stattfinden wird.

Es wird auf die Neugründung der

Europäischen Vereinigung für Krebsforschung

(European Association for Cancer Research) aufmerksam gemacht.

Zweck dieser Vereinbarung ist es, alle zwei Jahre einen wissenschaftlichen Krebskongreß abzuhalten; der erste wird im Oktober 1969 in der Schweiz stattfinden.

Anmeldeformulare und weitere Informationen können vom Sekretär der Vereinigung, Herrn Dr. G. J. V. SWAEN, Academisch Ziekenhuis Wilhelmina Gasthuis, Pathologisch-Anatomisch Laboratorium, Amsterdam-Oud West, Eerste Helmersstraat 104, Niederlande, erhalten werden.